LA GENETIQUE BACTERIENNE

I. Introduction

Les bactéries sont des organismes procaryotes qui ont une architecture cellulaire caractérisée par l'absence de membrane nucléaire à la différence des cellules eucaryotes.

Les bactéries se multiplient par scissiparité, c'est-à-dire par accroissement de la taille et de la masse qui va de paire avec la réplication de l'ADN génomique, et la formation d'un septum achève la division cellulaire.

Les caractères héréditaires sont conservés et transmis de génération en génération. Ils sont inscrits dans la structure de fragments de molécules d'ADN qu'on appelle « gènes » dont chacun contient l'information nécessaire à la synthèse d'une protéine spécifique.

II. Le génome bactérien :

1) Le nucléoide :

Les bactéries n'ont qu'un seul chromosome circulaire, ce chromosome condensé plus de 100 fois est associé à des protéines de type histone, et donne ainsi le nucléoide, c'est l'équivalent fonctionnel du noyau des cellules eucaryotes.

La réplication du chromosome bactérien est semi conservatrice.

La séparation des brins du chromosome parental vont servir de matrice pour la synthèse des brins complémentaires.

Les précurseurs de l'ADN sont des nucléotides triphosphate, en présence de l'ADN polymérase.

2) Les plasmides :

Ce sont des molécules circulaires d'ADN extra chromosomal capable de réplication autonome.

Les plasmides sont présentes chez une grande variété de bactéries aussi bien Gram+ et Gram -.

Parmi les propriétés des plasmides : ils vont coder pour la production d'exotoxines, hémolysines, et résistance aux antibiotiques…

3) Les bactériophages :

Ce sont les virus des bactéries, ils sont constitués d'un seul ADN ou ARN et d'une capside.

L'infection consiste en adsorption du virus sur l'enveloppe cellulaire externe au niveau de récepteurs spécifiques, injection de l'acide nucléique, inhibition des fonctions cellulaires, réplication et multiplication du matériel viral, synthèse des protéines de nouvelles capsides, assemblage des vérions, lyse de la bactérie hôte et libération des vérions.

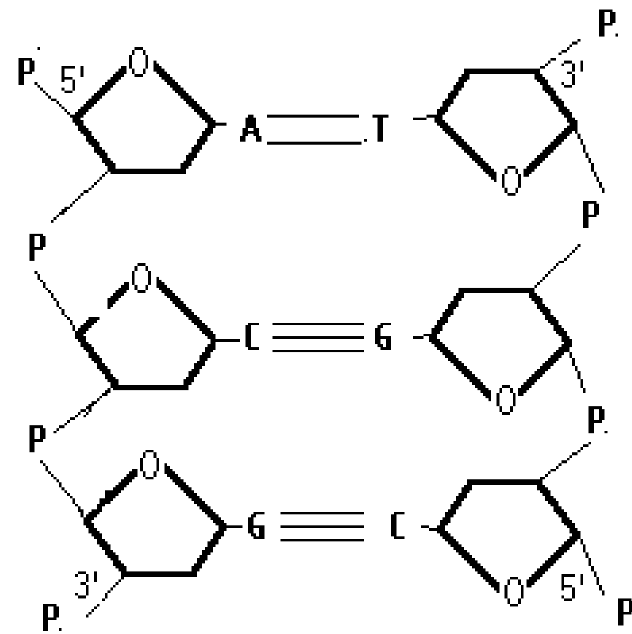
II. Rappels

I.1.Les acides nucléiques :

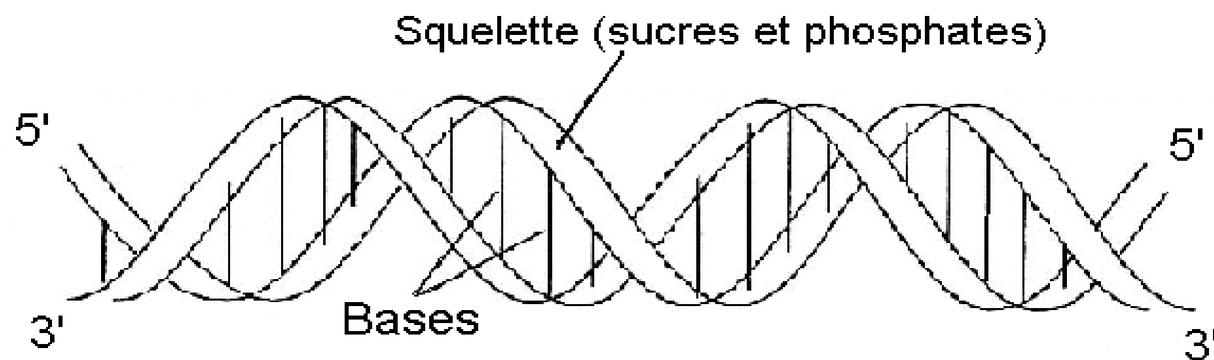
I.1.1.L'ADN (acide désoxyribonucléique) est un polymère formé d'unités élémentaires appelés nucléotides chaque nucléotide est composé d'une base azotée (respectivement adénine, cytosine, guanine, ou thymine), d'un sucre (désoxyribose) et d'un groupement phosphates. L'usage a consacré l'utilisation des simples lettres A, C, G, et T pour décrire la séquence de l'ADN.

L'ADN est en fait composé de deux brins se faisant face, et formant une double hélice. Ceci est possible car les nucléotides trouvés dans un brin possèdent des nucléotides complémentaires avec lesquels ils peuvent interagir par ce qu'on appelle des liaisons hydrogènes (liaisons faibles). Il y a deux liaisons hydrogènes entre A et T et trois entre C et G. En face d'une adénine, on trouve toujours une thymine; en face d'une cytosine, on trouve toujours une guanine.

Les deux brins d'ADN sont antiparallèles, c'est-à-dire assemblés tête bêche (l'extrémité 5' de l'un est en contact avec l'extrémité 3' de l'autre et *inversement*)



Polarité opposée des deux brins d'ADN



Structure tridimensionnelle de la double hélice d'ADN

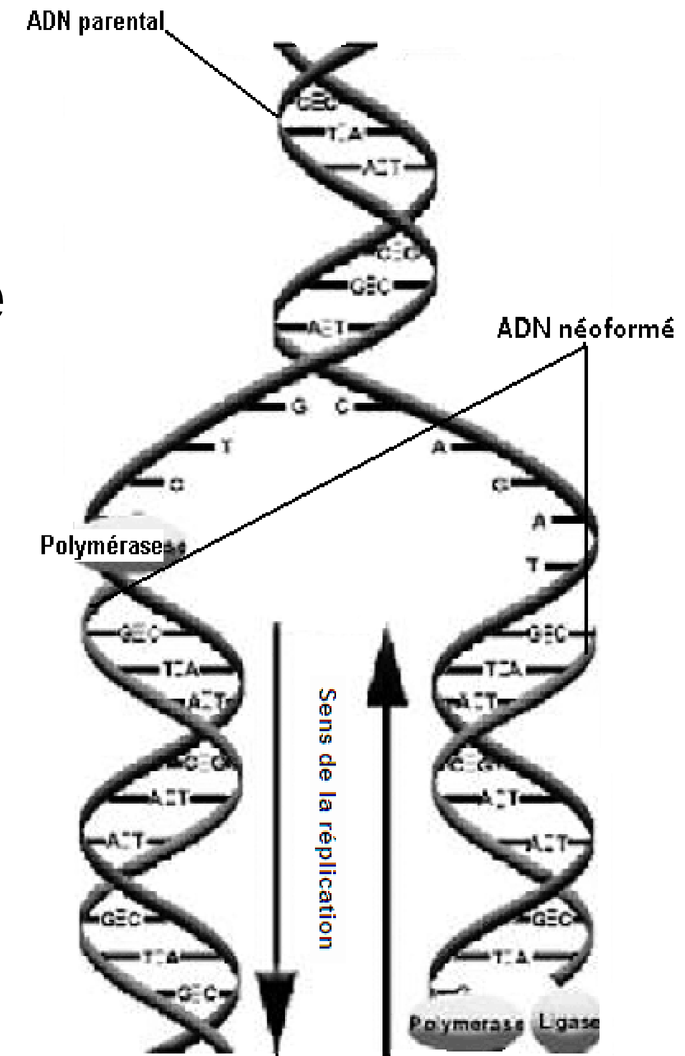
I.1.2.L'ARN (acide ribonucléique) est un polymère linéaire comprenant quatre types de nucléotides, où le sucre est un ribose, et où l'Uracile (U) remplace la thymine.

- ## I. 2. Réplication de l'ADN :

La synthèse de l'ADN ou *réplication* est un *processus semi-conservatif.* Avant la division de la cellule, les deux chaînes de l'ADN se séparent et chacune sert de matrice pour la synthèse de la chaîne complémentaire (ADN néoformé).

La polymérisation des nucléotides est catalysée par une enzyme, l'ADN-polymérase qui ne fonctionne que dans une direction, de 5'H vers 3'H.

Sur un brin la synthèse se fait directement en copiant la matrice et sur l'autre brin la synthèse se fait par petits fragments d'ADN, appelés fragments d'Okazaki



La réplication

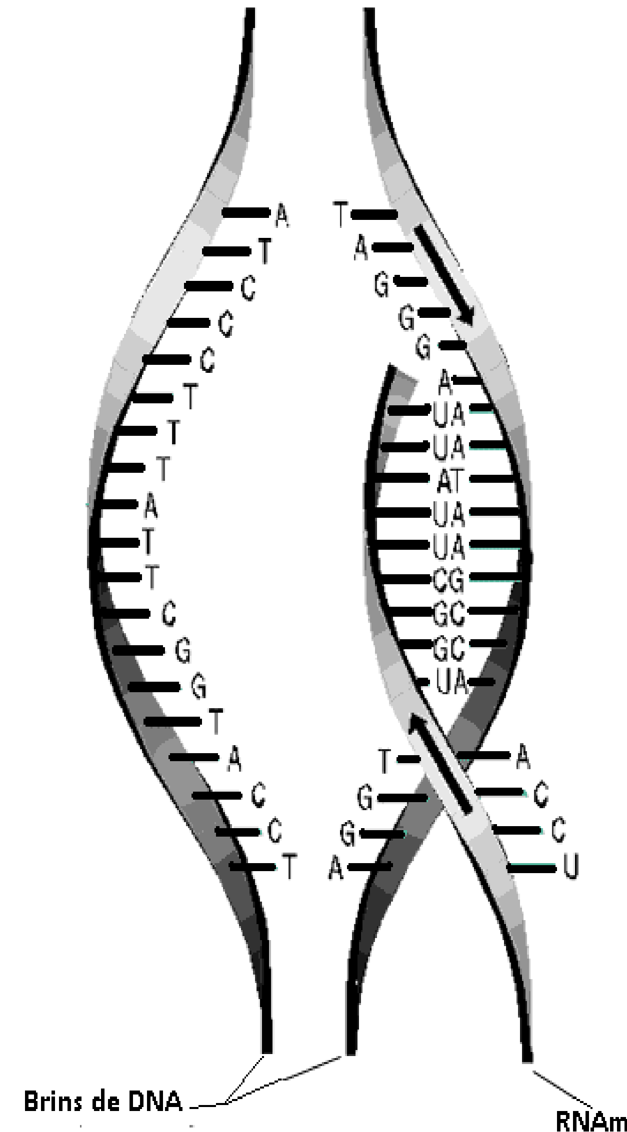
I.3. La synthèse des protéines

I.3.1. La transcription

La première étape de la synthèse protéique est la synthèse d'une copie du gène.

La molécule synthétisée n'est toutefois pas de l'ADN mais de l'ARN.

L'ARN synthétisée est une ARN messager (ARNm) qui va servir comme matrice pour la synthèse des protéines au niveau des ribosomes.



Transcription de l'ADN en ARNm

I.3.2. La traduction

La traduction est un processus complexe, auquel participent non seulement l'ARNm et le ribosome, mais aussi les ARNt et une série de facteurs cytoplasmiques catalysant l'une ou l'autre étape du schéma de polymérisation.

La synthèse protéique se fait en trois étapes: l'initiation, l'élongation et la terminaison. Elle est liée à la dissociation périodique du ribosome 70 S dans ses sous-unités lors de la terminaison et à leur réassociation lors de l'initiation, étapes caractérisant le *cycle ribosomal*.

II. LES VARIATIONS GENETIQUES

II.1. La mutation

II.1.1. Définition : la mutation est un changement du nombre ou de la séquence des bases nucléotidiques de l'ADN, elle est spontanée ou provoquée par un agent mutagène (Acide nitreux, Rayons X, Rayons Gamma.

II.1.2. Mécanisme moléculaires des mutations :

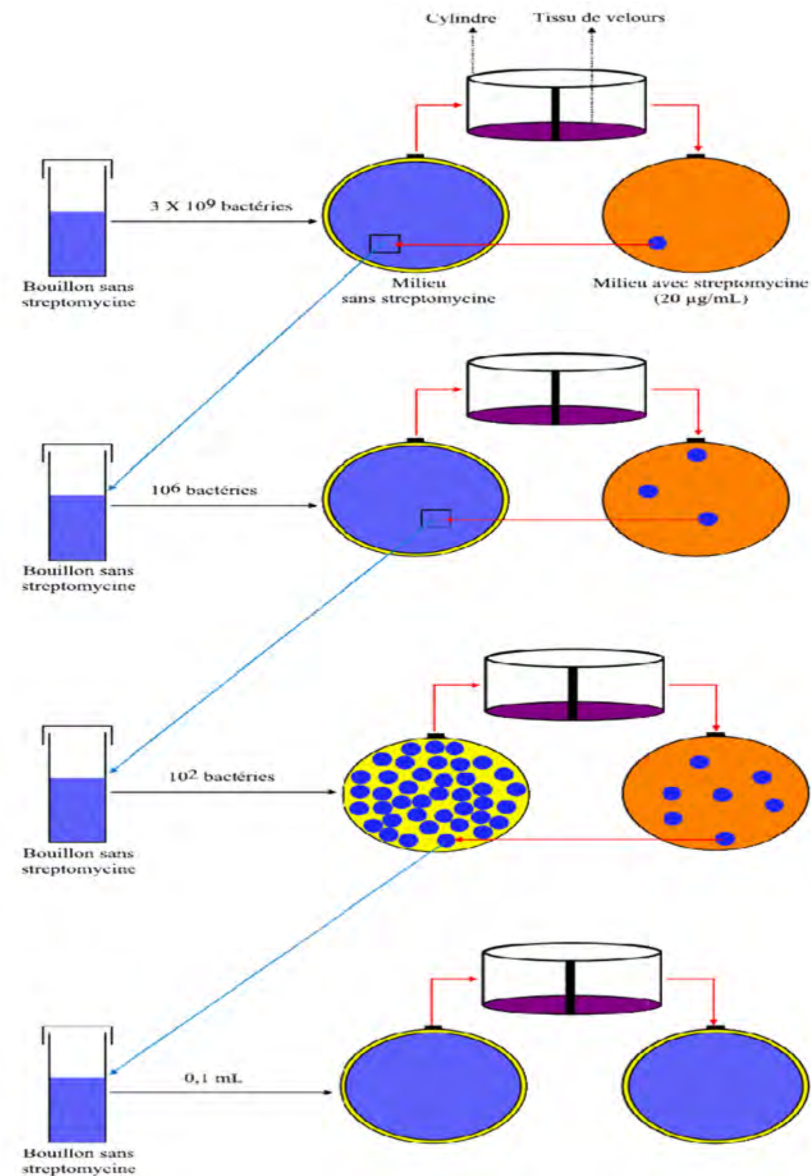
La variation génotypique héréditaire peut résulter, soit d'une modification du mécanisme de traduction de l'information, soit le plus fréquemment d'une modification du texte génétique.

- **Par suppression de toute une séquence (délétion)**
- **Par l'insertion d'une séquence étrangère (macro-insertion)**
- **Par le remplacement d'un nucléotide par un autre (mutation ponctuelle)**
- **Par la suppression ou l'insertion d'un nucléotide (micro-délétion ou micro-insertion).**

II.1.3. Caractères de la mutation :

Les mutations bactériennes comme celles observées à partir des autres organismes se caractérisent par leur rareté, leur spécificité, leur stabilité et leur spontanéité.

II.1.3.1.Spontanéité : La spontanéité de la mutation a été prouvée par l'expérience des répliques de Lederberg.



Expérience de LEDERBERG ou test des répliques au tampon de velours

Les milieux contenant de la streptomycine ont servi uniquement au repérage des mutants qu'ils ont sélectionné. Mais la population que nous avons obtenue n'a jamais été elle, au contact de l'antibiotique, ce qui démontre sans aucune ambigüité possible que la mutation se produit spontanément, en l'absence de l'agent sélecteur, en l'occurrence de la Streptomycine.

II.1.3.2.Rareté

Cette rareté est mesurable par le taux de mutation qui est la probabilité pour une bactérie de muter pendant une unité de temps définie (souvent le temps de génération).
Ce taux de mutation est de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-8}.

Cependant la fréquence des mutations bactériennes est considérablement augmentée par les agents mutagènes qui sont des agents physiques ou chimiques qui modifient la structure d'une molécule d'ADN, et augmentent le taux de mutation pour l'ensemble des caractères.
Exemple : Rayons UV, RX, etc..

II.1.3.3.Stabilité

Le caractère acquis par la mutation est alors transmissible à la descendance de génération en génération. Toutefois ceci n'exclut pas le retour au caractère d'origine par mutation reverse avec un taux de mutation spécifique différent de celui de la mutation initiale.

II.1.3.4.Spécifique et indépendante

Toute mutation survient indépendamment d'autres mutations éventuelles

II.2. Les recombinaisons génétiques

La bactérie peut être l'objet de variations génétiques autres que la mutation. Celles-ci peuvent résulter de transfert de matériel génétique d'une bactérie à une autre par 3 processus qui sont : la transformation, la conjugaison, la transduction et la conversion.

Les deux premiers ne mettent en jeu que des éléments bactériens, alors que les deux derniers font intervenir en plus le bactériophage.

II.2.1. La transformation

C'est un mécanisme par lequel il y a un transfert d'ADN d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice dite en état de compétence.

Le phénomène découvert par Griffith en 1928 n'a été compris qu'en 1944 à la suite des expériences d'Avery, Mac Leod et Mac Carthy. C'est à propos du pneumocoque que le phénomène a été décrit par Griffith. Ces bactéries, se présentent sous deux types morphologiques. La forme S (Smooth), elles sont encapsulées et virulentes, injectées à la souris elles déclenchent une septicémie mortelle en 24 à 48 heures.

Elles peuvent par mutation, se transformer en forme R (Rough) non capsulées et dénuées de tout pouvoir pathogène. La virulence du pneumocoque est associée à la substance polysaccharidique de la capsule.

Par injection intra péritonéale à la souris, Griffith a constaté :
Que les pneumocoques vivants de types S provoquent une septicémie mortelle

Que les pneumocoques de types S tués par la chaleur laissent les souris vivantes

Qu'un mutant non capsulé de type R n'entraine pas la mort des souris quel que soit le sérotype capsulé dont il provient.

Qu'un mélange de pneumocoques de types S tués et de pneumocoques de types R vivants tue les souris par septicémie et dans le sang de la souris on retrouve des pneumocoques de type S encapsulé.

Qu'un mélange de pneumocoques tués sans ADN du type S et de pneumocoques de types R vivants n'entraine pas la mort des souris.

Qu'un mélange de pneumocoques de types R vivants et de l'ADN extrait de pneumocoques du type S tue les souris par septicémie et dans le sang de la souris on retrouve des pneumocoques de type S encapsulé.

Conclusions

Les cultures de pneumocoque de type S tués contient un principe transformant qui modifie les bactéries R vivantes en les rendant Smooth.

n°	expériences		état de la souris	analyse du sang de la souris
1	pneumocoques S vivants	pneumocoques S vivants	mort	présence de très nombreux pneumocoques S vivants
2	pneumocoques R vivants	pneumocoques R vivants	survie	absence de tout pneumocoque
3	capsule détruite pneumocoques S tués	pneumocoques S tués	survie	absence de tout pneumocoque
4	pneumocoques S tués + pneumocoques R vivants	pneumocoques S tués + pneumocoques R vivants	mort	Présence de très nombreux pneumocoques S vivants
5	pneumocoques S tués et sans ADN + pneumocoques R vivants	pneumocoques S tués et sans ADN + pneumocoques R vivants	survie	absence de tout pneumocoque
6	pneumocoques R vivants +ADN extrait de pneumocoques S	pneumocoques R vivants + ADN extrait de pneumocoques S	mort	Présence de très nombreux pneumocoques S vivants

Expérience de Griffith

Avery et ses collaborateurs démontrent que la substance responsable de la transformation n'est autre que l'ADN. C'est l'ADN des bactéries S tuées qui est responsable chez les bactéries R vivantes de la synthèse d'une capsule de type S.

La transformation naturelle peut s'observer chez un nombre limité d'espèces bactériennes à GRAM positif (streptocoques et *Bacillus*) ou à GRAM négatif (*Neisseria*, *Branhamella, Acinetobacter*, *Haemophilus*)

II.2.2. la conjugaison

La conjugaison est un transfert du matériel génétique qui s'effectue entre des bactéries "sexuellement" différenciées et qui nécessite un contact étroit entre une bactérie donatrice (ou mâle) et une bactérie réceptrice (ou femelle). Le matériel transféré peut être chromosomique ou extra chromosomique (plasmide).

Découverte du phénomène :

Pour étudier les phénomènes de conjugaison, Lederberg et Tatum (1946) utilisèrent deux souches d'*E.coli* K12 poly-auxotrophes :

Souche A : T+ L+ B1+ Ph- B-

Souche B : T- L- B1- Ph+ B+

T= Threonine, L= Leucine, Ph=Phenyl alanine, B= Biotine, B1= vitamine B1

Dans un premier temps Ils étalent 10^9 bactéries A et 10^9 bactéries B sur deux géloses séparées dépourvues de facteurs de croissance indispensables. Après un temps habituel d'incubation, aucune colonie n'a poussé.

Par contre, S'ils étalent un mélange de 10^8 bactéries A et 10^8 bactéries B, une centaine de colonies deviennent visibles. Ces colonies sont T+ L+ B1+ Ph+ B+ : ce sont des recombinants.

La possibilité d'apparition de mutants doit être, ici, exclue car si elle survient avec une fréquence de 10^{-7} pour un caractère, la mutation double ou triple apparaitrait avec une fréquence respective de 10^{-14} ou de 10^{-21} ce qui ne correspond pas au résultat observé. Les colonies apparues proviennent donc bien de recombinants, c'est-à-dire de bactéries réceptrices qui ont acquis un ou plusieurs caractères nouveaux appartenant à une bactérie donatrice.

II.2.2.1. Différenciation sexuelle et facteur de fertilité

Les deux souches parentales ne jouent pas le même rôle au cours du croisement, d'où la notion de différenciation sexuelle. Pour le prouver, Hayes a sélectionné, puis couplé, des souches A et B sensibles ou résistantes à la Streptomycine. Il a constaté alors que la Streptomycine stérilise le croisement Ar X Bs (s= sensible, r= résistant), mais n'a aucune action sur le croisement As X Br dont les descendants sont devenus prototrophes pour les cinq facteurs considérés.

Les bactéries A sont « donatrices » de gènes. Elles se comportent comme des males puisqu'elles peuvent transférer les gènes T+ L+ B+ B1+. Elles contiennent un agent infectieux capable de passer d'une bactérie à une autre. Cette agent est appelé facteur sexuel ou facteur F (facteur de fertilité), et les bactéries qui le possèdent sont dites F+ (bactérie mâle).

Les bactéries B sont « réceptrice « des gènes. Elles jouent le rôle de femelles et doivent survivre au cours du croisement. C'est pourquoi l'accouplement Ar X Bs ne donne naissance à aucun recombinant.

Bactérie F+ **Le facteur F est constitué d'ADN. Sa longueur représente 2% de celle du chromosome d'E.coli. La présence du facteur F entraine la synthèse spécifique du pili appelée pili F ou pili sexuel.**

Ces pili F servent de « câbles d'amarrage » permettant l'accouplement. Ce n'est que par la suite qu'un véritable pont cytoplasmique se constitue en vue du transfert.

Mutants Hfr Il existe également les mutants Hfr (Haute fréquence de recombinaison) qui se distinguent par leproduit de leur croisement avec les bactéries F-.

Dans le croisement F+ X F- les bactéries femelles deviennent mâles, mais on isole très peu de recombinants.

Dans le croisement Hfr X F-, on obtient 100 fois plus de recombinants mais par contre très peu de bactéries F- deviennent mâles.

La mutation F+ Hfr correspond à une intégration du facteur F dans le chromosome. Au moment de la conjugaison, la bactérie Hfr effectue une réplication de son ADN chromosomique.

<u>Remarque :</u>

Il peut y avoir au cours de la conjugaison, transfert de matéériel génétique extra-chromosomique ou plasmidique.

Ces plasmides peuvent intervenir :

Dans l'élaboration de bactéricines

Dans les phénomènes de résistance aux antibiotiques, le mécanisme sera étudié au chapitre : résistance des bactéries aux antibiotiques.

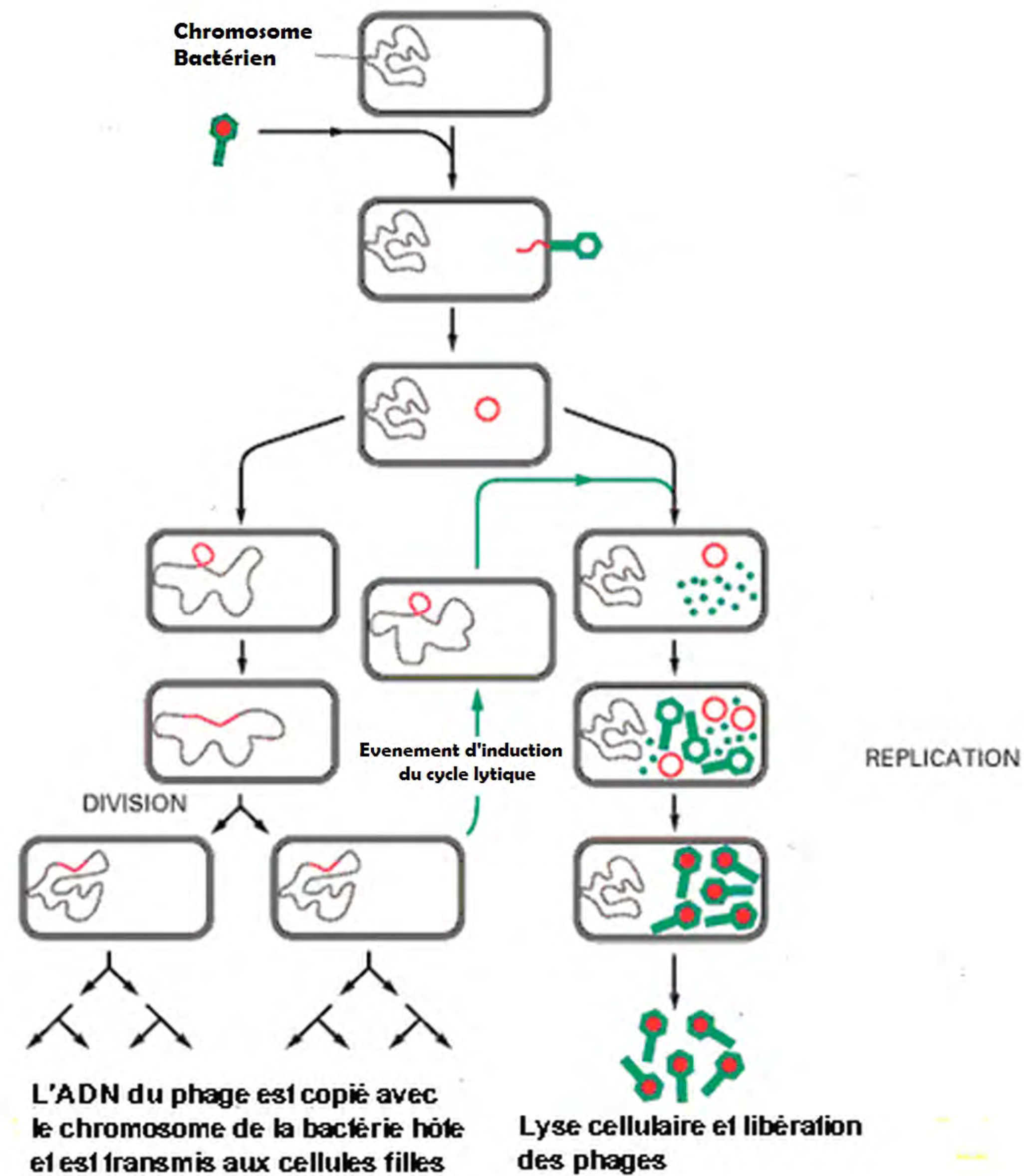
II.2.3.La transduction

La transduction est le transfert de matériel génétique (ADN chromosomique ou extra-chromosomique) d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire d'un bactériophage (le bactériophage est un virus des bactéries). Au moment de la multiplication végétative d'un phage tempéré, un fragment d'ADN bactérien est incorporé dans la capside avec l'ADN viral et ainsi transmis à une bactérie sensible à ce phage.

<u>II.2.4.1.Transduction généralisée :</u> dans la transduction généralisée et non spécifique, les phages possèdent une nucléase qui fragmente le chromosome bactérien à n'importe quel niveau de telle sorte que n'importe quel gène d'une bactérie donatrice peut être intégré dans la capside du phage et transféré à une bactérie réceptrice.

<u>II.2.4.2.Transduction restreinte</u> : Ce phénomène très particulier a été découvert avec le phage d'E.coli qui transfére uniquement la propriété de métaboliser le galactose.

Une fois libres, les bactériophages peuvent transférer aux bactéries réceptrices la propriété de métaboliser le galactose mais ces phages ayant perdu une partie de leur propre génome, ne pourront plus être répliqués. Ils sont dits phages défectifs.



La transduction

II.3. Les éléments génétiques mobiles à l'intérieur d'une bactérie

II.3.1. Transposon : ou élément transposable,

C'est une séquence d'ADN capable de se déplacer et de se multiplier de manière autonome dans un génome et qui permet également au gène de sauter d'une position chromosomique à une position plasmidique. Les éléments transposables les plus simples s'appellent "séquences d'insertion" (IS). Une IS est un simple gène qui code la transposase (enzyme effectuant la transposition).

Les transposons, généralement connus pour leur importance dans le transfert de fonctions, sont des éléments mobiles constitués d'une séquence d'ADN qui est encadrée par deux IS qui déplaceront la séquence qu'elles encadrent. Ces trois éléments forment le transposon et sont indissociables.

II.3.2. Intégrons : sont des éléments génétiques retrouvés exclusivement chez les bactéries. Ils constituent un système naturel de capture, d'expression et de dissémination des déterminants de résistances aux antibiotiques, le plus souvent portés par des plasmides ou des transposons. C'est donc une structure qui permet à des gènes de s'intégrer et de s'exprimer.

II.4. Application pratique :

Les techniques de biologie moléculaire pour l'identification d'espèce bactérienne ou d'une mutation responsable de résistance à un antibiotique, reposent sur la connaissance d'un ou plusieurs fragments (séquences) d'ADN bactérien.

La PCR, amplification d'un fragment d'ADN in vitro permet d'augmenter le nombre de copies de ce fragment en plusieurs exemplaires, ce qui permet de l'identifier facilement au laboratoire en quelques heures.

Cet avantage est mis à profit dans la détection des résistances chez des bactéries à multiplication lente ou difficile comme *M.tuberculosis*, mycoplasme, chlamydia par exemple. La détection de la résistance de *M.tuberculosis* à la rifampicine peut être obtenue au bout de 24 heures au lieu de 2 mois par les techniques classiques.